

## ラットのマイコプラズマ感染における肺病変形成に関与する 細胞性免疫の影響

菅 原 洋 行

札幌医科大学第3内科 (主任 鈴木 明 教授)

田 村 弘

帝京大学医学部動物実験施設

上 出 利 光

札幌医科大学第1病理 (主任 菊地浩吉 教授)

## The Effect of Cell-Mediated Immune Response in The Development of Lung Lesions in Rats with Mycoplasma pulmonis Infection

Hiroyuki SUGAWARA

*Department of Internal Medicine (Section 3),  
Sapporo Medical College (Chief : Prof. A. Suzuki)*

Hiroshi TAMURA

*Experimental Animal Center, School of Medicine,  
Teikyo University*

Toshimitsu UEDE

*Department of Pathology (Section 1),  
Sapporo Medical College (Chief : Prof. K. Kikuchi)*

**ABSTRACT** The pathogenesis of lung lesions evoked by *Mycoplasma pulmonis* (M. pul.) infection was studied. Intratracheal inoculation of  $1 \times 10^7$  colony forming units of M. pul. was performed by using pathogen free Lewis (LEW) and Fischer (F344) rats.

Upon inoculation of M. pul., the LEW rats developed bronchitis and bronchopneumonia at 2 and 4 weeks. Subsequently a thickening of the alveolar wall due to the infiltration of helper/inducer phenotype T cells and macrophages, and an accumulation of lymphocytes around the blood vessels were observed at 8 and 12 weeks. In contrast, F344 rats only developed mild hyperplasia of bronchus associated lymphoid tissues. In order to analyze the potential reasons for the strain difference in susceptibility to M. pul., we carried out various immunological analysis. First, *Mycoplasma* could be separated from not only the lung tissues of LEW rats, but also that of F344 rats. Antibody against M. pul. was detected in both strains. Second, although lymphocyte blastogenesis against B cell mitogens

### Abbreviation

BALT : bronchus associated lymphoid tissue  
Con A : Concanavalin A  
CFU : colony forming unit  
DTH : delayed type hypersensitivity  
FCS : fetal calf serum  
F344 : Fischer 344  
LEW : Lewis  
LPS : Lipopolysaccharide

M. pneumoniae : *Mycoplasma pneumoniae*  
M. pul. : *Mycoplasma pulmonis*  
M $\phi$  : macrophage  
PBS : phosphate buffered saline  
PHA : Phytohemagglutinin  
STM : *Salmonella typhimurium* mitogen  
T<sub>DTH</sub> : DTH type T  
CD4(+)T cell : helper/inducer T cell  
CD8(+)T cell : suppressor/cytotoxic T cell

in weak in F344 rats compared to LEW rats, lymphocyte blastogenesis against T cell mitogens, as well as *M. pul.* antigen, is the same for the two strains.

Thirdly, the striking difference was that *M. pul.*-infected LEW rats developed DTH (delayed type hypersensitive) reaction against *M. pul.* antigen, whereas F344 rats failed to do so. Furthermore, only lung tissue extract antigen evoked positive skin reaction in *M. pul.*-infected LEW rats.

These data collectively suggest that DTH reaction is involved in the development of lung lesions in *M. pul.*-infected rats. (Received April 22, 1988 and accepted May 23, 1988)

**Key words:** *Mycoplasma pulmonis*, DTH reaction, *Mycoplasma* infection

## 1 緒 言

*Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) を病因とするマイコプラズマ肺炎は、主に子供や青年層でみられる急性呼吸感染症で、ふつう適切な処置により良好な臨床経過をたどるが<sup>1)</sup>、中には遷延化し、重症の間質性肺炎に移行し、死に至る場合も報告されている<sup>2)</sup>。

本症は病理組織学的に気管支、細気管支周囲、肺動脈周囲および肺胞中隔へリンパ球浸潤があり、類上皮性肉芽腫なども認めることがあるだけでなく<sup>3)</sup>、*M. pneumoniae* を抗原とする皮内反応が成立することなどから<sup>4)</sup>、この肺炎の成立には細胞性免疫反応が重要な役割を果たしていると考えられている<sup>5)</sup>。

従来、種々の動物にみられるマイコプラズマ肺炎は多くの点でヒトのそれに類似していることから、種々の動物を用いた感染実験で、肺炎成立のメカニズムに関する研究がなされてきた<sup>6),7),8)</sup>。まず、ハムスターおよびモルモットは、ヒト由来の *M. pneumoniae* を接種したとき肺炎が起きることから、ヒトの肺炎の一部を再現していると考えられ、過去によく用いられていた。マウスの場合、すでに微生物学的、遺伝的条件の知られている種々のマウスを、その豊富なバックグラウンド情報を基に駆使し、種々の角度からマイコプラズマ肺炎に関する検討がなされてきている。しかし、肺炎成立に関与している細胞性免疫を検討する場合、ラットの *Mycoplasma pulmonis* (*M. pul.*) 感染症が最も有効な実験系のひとつであることが分かってきた。なぜなら、*M. pul.* 感染ラットは、ヒトマイコプラズマ肺炎患者と同様に、菌抗原に対する遅延型アレルギー (DTH: delayed type hypersensitivity) 反応の一つである皮内反応が容易に成立するが、この反応はもともとマウスでは難しいことが明らかにされているからである<sup>9)</sup>。

ラットの *M. pul.* による自然感染は、特に6～8週齢の young adult における感染例では重症の肺炎を発症

し、死亡するものが約10%に及ぶことも稀でない。大学等のラット飼育室で極く普通にみられる呼吸器感染症であるが、長年 *M. pul.* を用いてラットに肺炎を再現させることができていなかった<sup>9)</sup>。しかし、Davis とその共同研究者ら<sup>10),11)</sup> は、1982年、彼らを選び出した *M. pul.* を病原体 free の Lewis (LEW) ラットに接種することにより、初めて自然感染に類似した肺炎を再現することに成功した。従って、私共もラットの *M. pul.* 感染実験系を作り出すべく検討したところ、予備実験で Davis ら<sup>10),11)</sup> と同程度の肺炎形成能のある *M. pul.* を野外の *M. pul.* 感染ラットから分離することができた。

今回は Davis ら<sup>10),11),12)</sup> の実験成績と十分比較できるように、LEW ラットと Fischer (F344) ラットの実験系を用意し、免疫病理組織学的観察、リンパ球幼若化反応、リンパ球 subset の laser cytoflowmetry による検索、皮内反応、血清反応などの手法を用い、*M. pul.* 感染ラットの肺炎成立メカニズムに関与する種々の細胞性免疫について検討を行った。

## 2 材料及び方法

### 2.1 動物と飼育条件

SPF (specific pathogen free) ラットは、近交系の LEW/Crj (Wistar Lewis) と F344/DuCrj (Fischer) で、6週齢のものを日本チャールズ・リバーから購入し、帝京大学医学部動物実験施設のラット用 SPF 飼育室に入れ、8週齢で感染実験室に移し、実験に用いた。飼育条件は、ホワイトフレック (日本チャールズ・リバー) を入れたアルミニウムゲージ (265×425×150 mm) で3匹ずつ飼育し、放射線滅菌飼料 (FR-1: 船場農場) と水道水を自由に摂取させた。飼育室の空気調和システムはオールフレッシュ方式で、室温湿度はそれぞれ 23±2℃ と 55±15%、換気回数は15～18回/時に設定し、室内の明暗は14時間明、10時間暗に調節した。

### 2.2 マイコプラズマの分離と培養

### 2・2・1 供試菌 (M. pul.) 株

まず、帝京大学医学部動物実験施設の汚染動物飼育室で、1984年慢性呼吸器病を発症していたラットの呼吸器から、後に述べる方法でM. pul.を分離し、それぞれ3回クローニングを行い株化した。これらの菌株は酢酸タリウムを除いた、Hayflickの液体培地でscale upを計りながらさらに3回継代を行い、maximum growthの培養菌を小分けして接種用菌液とし、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。各菌株の毒力を調べるため、8週齢のLEWラットの気管内に $1 \times 10^7$  colony forming units (CFU)/匹ずつそれぞれ5匹宛接種して、4週間後に最も重症な間質性肺炎のみられたTKR-6株を選択し、今回の実験に用いた。

### 2・2・2 供試培地

マイコプラズマの分離、増菌、抗原作製用培地は、Hayflickらの処方<sup>13)</sup>に準じて用意した。培地100 mlの組成は、DifcoのPPLO agarまたはPPLO broth 70 ml,  $56^{\circ}\text{C}$ , 30分間非働化ウマ血清20 ml, 25%酵母エキス(ニッテンドライイースト; 自家製)10 mlに、ペニシリンGカリウム(万有製薬)10万単位, 2.5%酢酸タリウム(和光製薬)1 mlを加えたものである。

### 2・2・3 M. pul. 不活化抗原の作製

マイコプラズマの補体結合(CF)反応および足跡反応に用いたM. pul.抗原は、Chanockら<sup>14)</sup>の方法に準じて作製した。即ち、TKR-6株をHayflickの液体培地で $37^{\circ}\text{C}$ , 3日間培養した後、20,000 G, 30分間遠心し、沈渣をphosphate buffered saline (PBS; pH 7.2)で3回、上記と同じ条件で遠心洗浄し、最終沈渣を培養量の1/100量のPBSで再浮遊し、マーゾンを加え(0.01%)冷蔵庫の中で72時間不活化してから、20 KC, 5分間超音波処理した。このようにして得たM. pul.抗原をPBSで透析し、総蛋白量をLowry法<sup>15)</sup>で測定した後、小分けして $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

## 2・3 感染実験

### 2・3・1 感染実験の方法

ペントバルビタール(Pitman-Moore, INC, USA)の腹腔内注射(40 mg/kg)で麻酔した8週齢のラットの気管内へ、TKR-6株を $1 \times 10^7$  CFU/匹宛接種した。2, 4, 8, および12週間後にエーテル麻酔下で、大腿動脈から全採血後に剖検した。ここで得られた血清は後に血清反応に用いた。右肺上葉はM. pul.の分離培養用に採材し、残りの各肺葉は10%フォルマリンで固定し、パラフィン切片を作製してHematoxylin-Eosin染色を行うものと、凍結切片を作製して、酵素抗体法

による免疫組織学染色を行うものとに分けた。

### 2・3・2 肺からのM. pul.の分離培養

採取した肺は10倍(W/V)のTryptose phosphate both (TPB; Difco Laboratories)を加え、テフロン・ホモジナイザーで乳剤とした。M. pul.の定量培養は肺乳剤の0.3 mlを、2.7 mlずつ分注したTPBで10倍階段希釈列を作り、各希釈列から0.1 mlをとって、固形培地に接種した。 $37^{\circ}\text{C}$ , 7日間培養し、40倍の実体顕微鏡下で観察してM. pul.の典型的集落を確認し、原乳剤のCFU/mlを算定した。

また、M. pul.の同定は、Tamuraら<sup>16)</sup>の簡易同定法によって行った。その概略は、げっ歯類のマイコプラズマでは、M. pul.の集落のみが赤血球吸着能を有することを利用したのである。0.5%のニトリ赤血球加PBS懸濁液2.5 mlを集落形成した固形培地上にそそぎ、時々震盪しながら室温で30分間反応させた。次に赤血球懸濁液を捨て、PBSで洗浄し、マイコプラズマの集落への赤血球吸着能を実体顕微鏡下で確認した。

### 2・3・3 M. pul.のCF反応

Kolmerの変法<sup>17)</sup>を用いた。ラット血清はあらかじめVeronal buffered salineで1:4に希釈して非働化( $56^{\circ}\text{C}$ , 30分間加熱)し、1:4から1:128まで倍数希釈した25  $\mu\text{l}$ の血清希釈列を96穴のマクロプレートに滴下した。次に、ラットのM. pul.感染血清を用いて定めたM. pul.の4単位抗原液25  $\mu\text{l}$ と、2単位の補体50  $\mu\text{l}$ を血清希釈列に加えて $4^{\circ}\text{C}$ で1晩静置した。さらに6%羊赤血球液と、3単位の溶血素を等量混合後、室温で15分間反応させた感作血球液(3%)を25  $\mu\text{l}$ 加え、 $37^{\circ}\text{C}$ 30分間加温後、冷却し、血球の落下を待つて判定した。補体結合価(CF titer)は、50%以上の非溶血を示した最大血清希釈倍数をもって表した。

### 2・3・4 単クローン抗体およびレクチン

ラットのT細胞マーカー(CD5)抗体R1-3B3とラットのキラー・サプレッサーT細胞マーカー(CD8)抗体R1-10B5は、Matsuuraら<sup>18)</sup>が作製したものを、ラットのヘルパー・インデューサーT細胞マーカー(CD4)抗体W3/25<sup>19)</sup>は、Sera-Lab, England製のものを、そのほかに使用したR2-1A6抗体は、Ishiiら<sup>20)</sup>が作製したもので、ラットのマクロファージ(M $\phi$ )、顆粒球のマーカーである。この抗体は肺胞M $\phi$ の約61%で陽性となるが、T細胞との間に交叉反応性を認めない<sup>20)</sup>という特徴がある。

レクチンとしては、Concanavalin A (Con A)と、Phytohemagglutinin (PHA), Lipopolysaccharide (LPS)は、bio-yeda Ltd. (Israel)製で、Sal-

monella typhimurium mitogen (STM) はRIBI Immunochem Research Inc. (USA) 製のものを用意した。

### 2・3・5 Laser cytoflowmetry を用いたリンパ球表面抗原の解析法

ラットからの肺摘出はHunninghakeらの方法<sup>21)</sup>に準じて行い、肺からのリンパ球分離はLiuらの方法<sup>22)</sup>に従った。これらの方法の概略は、ラットをエーテルで麻酔して開腹後、直ちに下大静脈と大腿動脈に翼状針を留置して、下大静脈から生食を注入して灌流し脱血した。次に肺を滅菌シャーレの中に取り出し、ハサミで1-2 mm 角に細切後、collagenase type I (Worthington Biochemical Corp., USA) 50U/ml を含む5 Fetal calf serum (FCS) 加 RPMI 1640 (GIBCO) 培養液 (L-glutamine  $2 \times 10^{-3}$  M, penicillin G 100U/ml, Streptomycin 100 $\mu$ g/ml を含む) に浮遊し、37°C, 30 分間反応させた。次に60 番メッシュ (ステンレス製) を通し、300G, 10 分間遠心し、沈渣を培養液で3 回遠心して洗浄した。この細胞浮遊液を、Ficoll-Conray (d=1.096) に重層し、250 g, 10 分間遠心し、中間層からリンパ球を採取 (Ficoll-Conray 比重遠心法) し、血球計算盤で細胞数を算定した。

肺から得たリンパ球の各単クローン抗体に反応する細胞の算定は、はじめ単クローン抗体と1 時間反応させ、さらに FITC 標識ヤギ抗マウス IgG:F(ab')<sub>2</sub> (Cappel Laboratories Inc., USA) と30 分間反応させた後、laser cytoflowmetry (Ortho Spectrum III, Ortho Diagnostic System Inc. USA) を用い常法に従って計測した。

### 2・3・6 免疫組織学的検索

酵素抗体法による検索に用いる肺の組織標本は、まず肺を2 mm の厚さに薄切して、Tissue-Tek II (Miles Laboratories, Inc., USA) 内に包埋し、液体窒素で凍結した。次にその凍結ブロックからcryostatで厚さ4  $\mu$ m の連続組織切片を作製し、風乾後、4°C, 10 分間アセトンで固定した。組織切片はさらに風乾後、ABC法<sup>23)</sup>にしたがって酵素抗体法を行った。その手順は、(1)肺の組織切片を、単クローン抗体と90 分間反応させ、(2)冷 PBS で30 分間洗浄した後、(3)ビオチン化ヤギ抗マウス血清 (自家製) と30 分間反応させた。(4)次に、冷 PBS で30 分間洗浄後、(5)Avidin Biotin-peroxidase Complex (Vector Laboratories Inc., USA) と30 分間反応させ、(6)冷 PBS で30 分間洗浄後、(7)peroxidase 反応基質 [0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加, 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride,

50 mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.6)] 中で発色させた<sup>24)</sup>。(8)つづいて20%フォルマリンで30 分間固定後、(9)0.25%メチルグリーン溶液で核染色し、アルコール系列で脱水し、キシロールで透徹した後、(10)Bioleit (高研) で封入し、観察に供した。

## 2・4 リンパ球幼化反応

### 2・4・1 脾細胞の分離

無菌的に採取したラットの脾臓を10%FCS 加, RPMI 1640 培養液中で小片に細切し、これを2 枚のすりガラス間に挟んですりつぶした。このようにして得た脾細胞の浮遊液を、200 番メッシュ (ステンレス製) を通した後、リンパ球から死細胞と赤血球をFicoll-Conray (d=1.096) 比重遠心法によって除去し<sup>25)</sup>、培養液で3 回洗浄後、所定の細胞濃度に調節した。

### 2・4・2 各種マイトージェンと M. pul. 抗原によるリンパ球幼若化反応

リンパ球幼若化反応はBradleyの方法<sup>26)</sup>に準じて行った。ラットの脾細胞をcomplete medium (RPMI 1640 培養液に、 $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin G, 100 $\mu$ g/ml streptomycin,  $2 \times 10^{-3}$  M L-glutamine および10%FCS を加えたもの) で、 $5 \times 10^6$ /ml に調整し、96 穴の平底マイクロプレート (Becton Dickinson Labware, USA) に0.1 ml ずつ分注した。各種マイトージェンと M. pul. 抗原の希釈列を用意して0.1 ml ずつ加え、37°C のCO<sub>2</sub> 恒温器内で5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養時間は24, 48, 72 時間、および、一部は96 時間で、培養終了時の4 時間前に1 $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham International, England) を加え、MASH II harvester (Microbiological Associates, U. S. A.) で細胞を回収し、細胞内に取り込まれた<sup>3</sup>H-thymidine をシンチレーション・カクテル (1 l のToluene にp-bis-2 (5-phenyl-oxazolyl) benzene 100mg と2, 5-diphenyl-oxazole 5 g を加えたもの) に溶出させた後、シンチレーション・カウンターで放射活性を測定した。

### 2・4・3 刺激係数 (S. I., Stimulation Index, S. I.) の算出法

各マイトージェンによるS. I.値は、下記の算定式のごとくで、マイトージェン添加群と非添加対照群の放射活性の比率で表した。

S. I.=実験群の平均cpm (counts per minute)/対照群の平均cpm

## 2.5 足蹠反応 (遅延型アレルギー反応)

### 2.5.1 M. pul. 抗原を用いた足蹠反応

ラットの一方の足蹠に蛋白濃度 1.2 mg/ml の M. pul. 抗原液を、もう一方の足蹠には PBS を 0.1 ml ずつ皮下注射し、48 時間後に足蹠の厚さをノギスで測定した。

### 2.5.2 多種臓器抗原を用いた感染ラットの足蹠反応

臓器抗原の製法は、正常 LEW ラットの肺や肝、骨格筋、脾、腎などを PBS 中で細切した後、ガラスホモジナイザーですりつぶし、20 KC, 10 分間超音波処理した。さらに各組織抽出液は、1,500G, 30 分間遠心後、その上清は総蛋白含有量を Lowry 法で測定後、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

M. pul. 感染後 8 週の LEW ラット各 2 匹に各種臓器抗原液 (蛋白濃度; 1.2 mg/ml) を一方の後肢足蹠に、他方の後肢足蹠に PBS を 0.1 ml ずつ注射し、48 時間後に左右足蹠の厚さをノギスで計測した。

## 3 成績

### 3.1 M. pul. 感染ラットにおける肺の病理組織学的所見

M. pul. を LEW, F344 ラットに経気管的に接種し、2, 4, 8 および 12 週目の肺の組織像を観察した。LEW ラットは、感染 2 週目で、気管支及び細気管支内腔に好中球、マクロファージ、剥離した気管支上皮細胞などを含む浸出液が貯留し、一部の細気管支周囲肺胞内では、好中球の浸出をみる小葉中心性の気管支肺炎を認めた (Fig 1-a)。気管支周囲の単核細胞浸潤は、感染 2 週から 12 週目まで認められたが、とくに 8 週と 12 週目における単核細胞はリンパ球が主体であった (Fig 1-a, b, c)。また、感染後 8 週と 12 週目では、肺動脈周囲にも単核細胞浸潤が認められ、同時に肺動脈周囲の単核細胞浸潤による肥厚も認められた (Fig 1-d)。

これに対して、F344 ラットでは全経過中に気管支炎や気管支肺炎、間質性肺炎といえる組織像を認めることはできなかった。しかし、感染後 8, 12 週目には、bronchus associated lymphoid tissue (BALT) の過形成が認められた (Fig 1-e, f)。

したがって、LEW ラットは感染後 4 週目までの気管支炎と細気管支炎を主とする急性病変と、感染後 8 週目における胞隔炎と気管支肺動脈周囲リンパ球浸潤を主とする慢性病変という二相性病理組織像を示していた。しかし、F344 ラットでは明瞭な肺病変を示さなかった (Table 1)。

### 3.2 M. pul. 感染ラット肺からの菌分離

M. pul. を接種したラットの肺における菌の推移を Fig. 2 に示した。感染後 2 週から 12 週目までの LEW 及び F344 ラットの肺から、いずれも菌が分離された。しかし、LEW ラットでは、感染後 2 週から 4 週にピークを有する増殖曲線を示したが、F344 ラットでは観察期間中とくにピークは見られなかった。また、感染後 8 週、および 12 週目では、LEW 及び F344 ラット間で菌量に差を認めなかった。

### 3.3 M. pul. 感染ラットの M. pul. に対する CF 反応の推移

Fig. 3 に示したごとく、LEW ラットの M. pul. に対する抗体価は、感染後 2 週目で急激に上昇し、4 週目で  $35.2 \pm 7.5$  倍とピークになり、以後漸減する傾向が認められた。しかし、F344 ラットでは感染後 2 週目の  $12.8 \pm 4.4$  倍が最高であり、4 週目ではすでに抗体価は低下し、12 週目には  $4.0 \pm 0$  まで低下した。

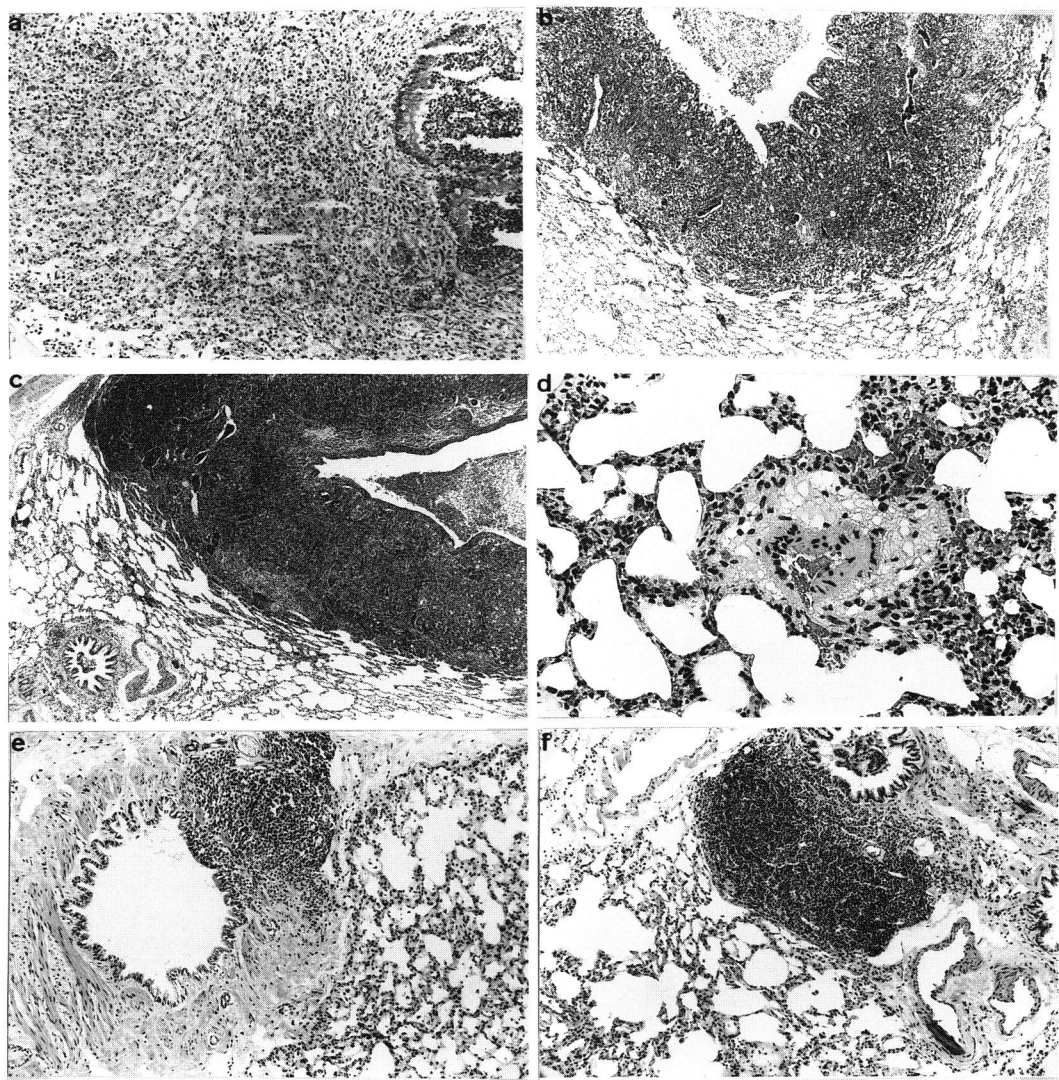
### 3.4 M. pul. 感染ラットの肺に浸潤するリンパ球数

正常コントロールラットおよび感染ラットの肺に浸潤するリンパ球数を Fig. 4 に示した。正常ラットの肺に浸潤するリンパ球数 (0 week after inoculation) は LEW ラットが  $(2.33 \pm 0.45) \times 10^6$  で、F344 ラットは  $(2.06 \pm 0.24) \times 10^6$  であり、両者の間に差を認めなかった。しかし、感染ラット肺に浸潤するリンパ球数を経時的観察した結果は、LEW ラットでは感染後 4 週から 8 週目をピークとして増加していたが、F344 ラットでは正常コントロールとの間に感染後 8 週目まで差を認めず、12 週目にはじめて軽度ではあるが明らかな増加を認めた。

### 3.5.1 各種マイトーゼンを用いたラット脾細胞のリンパ球幼若化反応

ラット脾リンパ球の T 細胞マイトーゼンである Con A と PHA に対する幼若化反応の結果を Fig. 5 に示した。Con A と PHA の各濃度における、各培養時間のラットリンパ球の S. I. 値は、いずれの測定値も同程度であった。従って、LEW および F344 ラットの脾細胞は、これら T 細胞マイトーゼンに対する増殖反応に差がないことを示唆している。

次に、B 細胞マイトーゼンである STM と LPS を用いて、LEW および F344 ラットでリンパ球幼若化反応を比較すると (Fig. 6)、培養時間が 1 日および 2 日目では、F344 ラットリンパ球の方が、LEW ラットよりいずれのマイトーゼンに対する反応 (S. I.) も高い傾向を示していたが、培養 3 日および 4 日目の S. I. 値は、LEW ラット脾細胞が F344 ラットに比べ有意



**Fig. 1** Photomicrograph of lung tissues in *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW and F344 rats. In LEW rats, bronchopneumonia was observed at 2 weeks after inoculation(a). Bronchitis and peribronchial mononuclear cell infiltration were observed at 4 weeks after inoculation(b). Peribronchial infiltration and mononuclear cell infiltration into the alveolar wall were observed at 8 and 12 weeks after inoculation (c and d). In F344 rats, only hyperplasia of bronchus associated lymphoid tissue was observed at 8 and 12 weeks after inoculation (e and f).

**Table 1** Strain difference of lung lesions found in *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW and F344 rats.

rat strain week after inoculation	LEW				F344			
	2	4	8	12	2	4	8	12
lunglesion								
1. bronchitis and bronchiolitis	++	++	+	+	-	-	-	-
2. BALT hyperplasia	+	++	++	++	-	-	+	+
3. peribronchial and periarterial mononuclear cell infiltration	++	++	+++	+++	-	-	-	-
4. interstitial pneumonia	-	+	++	++	-	-	-	-

a) The degree of evoked various lung lesions was examined microscopically and was scored on scale of + to +++, with +++ being the most severe. No lung lesion was expressed as -.

b) LEW and F344 rats were inoculated with  $1 \times 10^7$  colony forming units of *Mycoplasma pulmonis*. Rats were sacrificed and histological examination of lungs was performed at 2, 4, 8, and 12 weeks after inoculation.

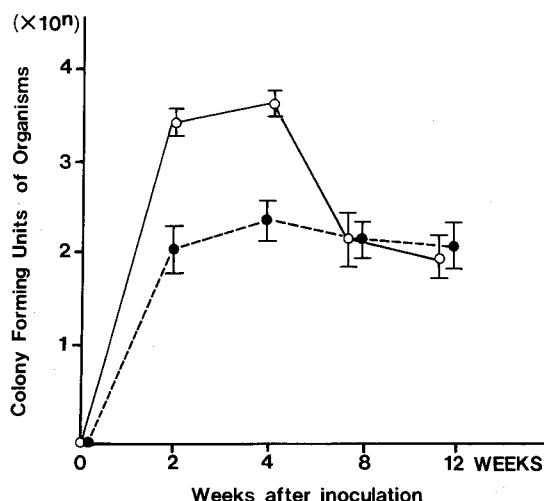


Fig. 2 Colony forming unit activity of lung tissues obtained from *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW(○) and F344(●) rats. At 8 and 12 weeks after inoculation, there was no significant difference between both strains of rats.

0 week : normal lung tissue of both strains of rats.

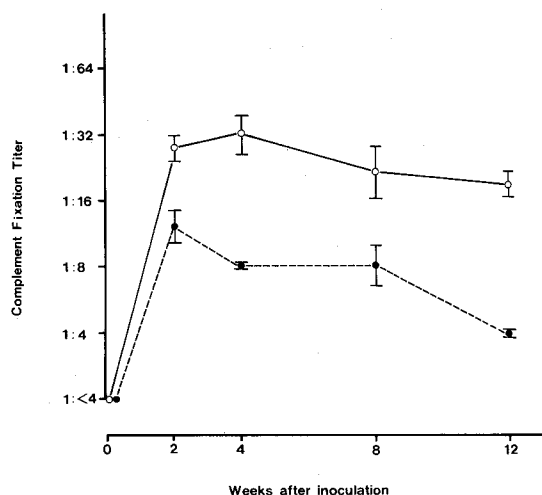


Fig. 3 Kinetics of complement fixation titer against *Mycoplasma pulmonis* in *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW(○) and F344(●) rats. There was significant difference between both strains of rats at any week after inoculation.

( $p < 0.01$ ) に高い幼若化反応を示していた。

### 3・5・2 M. pul.抗原による脾細胞の幼若化反応

M. pul.抗原に対する LEW および F344 ラット脾細胞の幼若化反応を検討した(Fig. 7)。LEW ラットでは、2 日目に最も高い反応性を示したが、3 日目以降は順

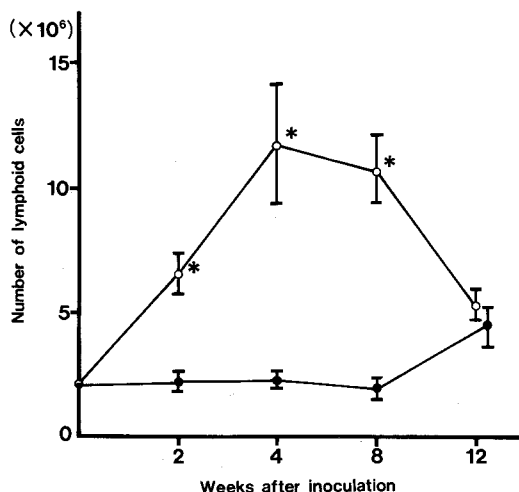


Fig. 4 Total number of lymphoid cells isolated from lungs of *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW (○) and F344(●) rats. Data was based on 5 different *Mycoplasma* infected rats. Values represent a mean  $\pm$  S. D. \*Denotes lymphocyte cell number obtained from LEW rats significantly different from that obtained from F344 rats ( $P < 0.0001$ ).

に反応が低下していた。また、S. I.値が最も高くなる菌体抗原の濃度は  $3.0 \mu\text{g/ml}$  で 13.4 であった。F344 ラットで S. I.値が最も高い値を示す条件は、菌体抗原が  $3.0 \mu\text{g/ml}$  のときの 3 日目で 34.1 であった。即ち、M. pul.菌体抗原に対するリンパ球の幼若化反応では、F344 ラット脾細胞の方が LEW ラットよりも高い反応性を示した。

### 3・6・1 マイコプラズマ肺炎病巣に浸潤している T 細胞亜群の検索

肺から分離した総リンパ球に対する T 細胞の比率をみると、LEW ラット肺では経時的にリンパ球数が増加していたが、T 細胞の比率に大きな変化は認められなかった(Table 2)。しかし、F344 ラットでは、感染 4 週目における T 細胞の比率が 62.2% と一過性に上昇していた。

一方、CD4 陽性細胞-CD8 陽性細胞の比 (CD4/CD8) を LEW ラットでみると、感染 8 週目に 2.33 まで上昇し、CD4 陽性細胞優位性は亢進したが、12 週目では 1.59 と低下していた。しかし、F344 ラットでは感染前コントロールの CD4/CD8 値が 0.70 と、CD8 陽性細胞優位を示したが、感染 2 週目では一過性に CD4 陽性細胞優位 (1.64) を示したあと、感染 4 週目に再び CD8 陽性細胞優位 (0.87) となり、以後感染 8 週 (1.15) および 12 週目 (1.39) では CD4/CD8 値は上昇してい

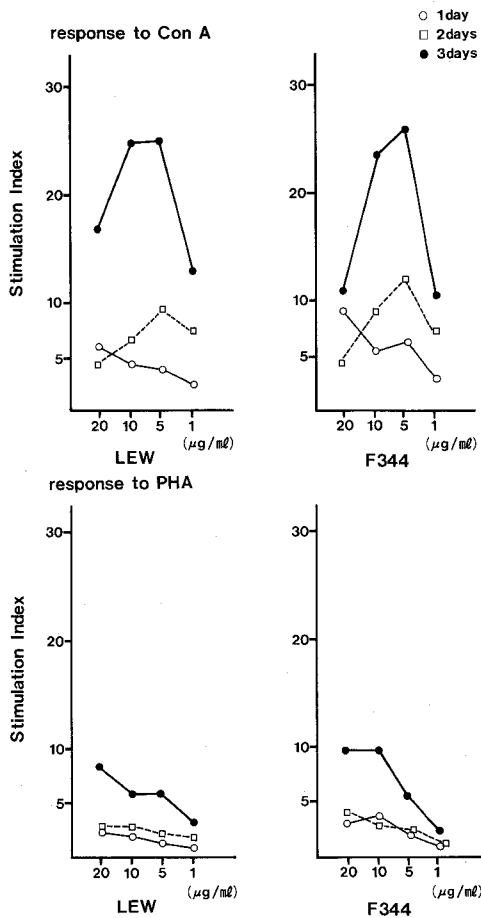


Fig. 5 Spleen cells obtained from LEW and F344 rats were cultured at a cell density of  $5 \times 10^5$  cells/culture in the presence of T cell mitogens (PHA and Con A) in complete medium for various days. Values represent Stimulation Index (S. I.).

た。

### 3・6・2 M. pul. 感染ラット脾細胞のT細胞亜群の検索

脾リンパ球に対するT細胞の比率を感染前のラットと比較すると、LEWおよびF344ラットともに感染2週目で減少していたが、感染4および8週目では増加する傾向を示していた(Table 3)。しかし、LEWラットの感染相におけるT細胞亜群の変動をみると、感染2週目にCD8陽性細胞優位( $CD4/CD8=0.91$ )となるが、感染4週以降はCD4陽性細胞優位を維持していた。一方、F344ラットでは、感染2週目に一過性のCD4陽性細胞優位( $CD4/CD8=1.12$ )を示すが、感染4週目以降はCD8陽性細胞優位を維持していた。

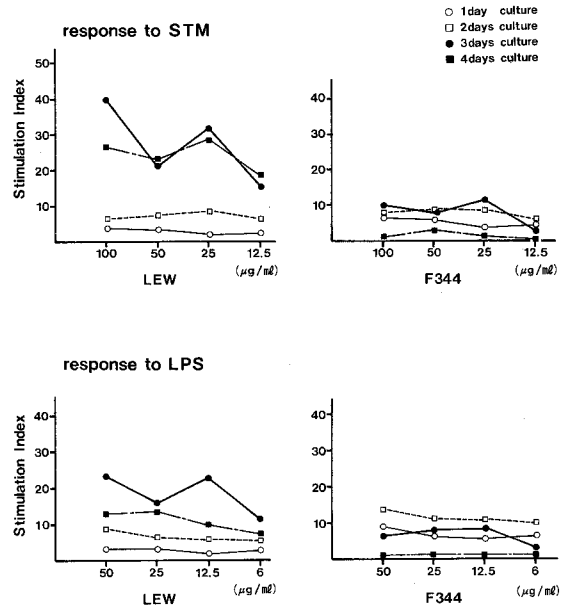


Fig. 6 Spleen cells obtained from LEW and F344 rats were cultured at a cell density of  $5 \times 10^5$  cells/culture in the presence of B cell mitogens (LPS and STM) in complete medium for various days. Values represent Stimulation Index (S. I.).

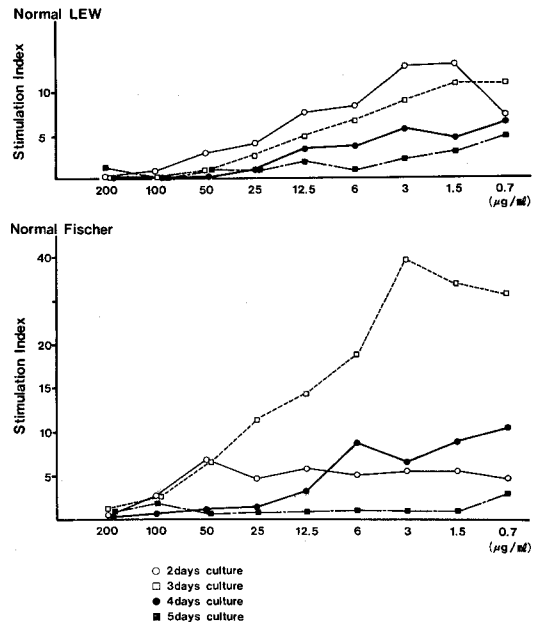


Fig. 7 Spleen cells obtained from LEW and F344 rats were cultured at a cell density of  $5 \times 10^5$  cells/culture in the presence of non-viable *Mycoplasma pulmonis* antigen in complete medium for various days. Values represent Stimulation Index (S. I.).



**Table 2** The percentage of T cell subsets of lymphocytes in the lung from LEW and F344 rats infected with *Mycoplasma pulmonis*.

weeks	0		2		4		8		12	
Mo. Ab. <sup>a)</sup>	LEW <sup>b)</sup>	F344	LEW	F344	LEW	F344	LEW	F344	LEW	F344
R1-3B3	44.2 <sup>c)</sup>	57.8	47.0	47.0	46.3	62.2	42.6	52.9	41.4	41.2
R1-10B5	26.7	43.6	18.4	18.4	16.3	36.0	12.9	26.3	18.2	20.8
W3/25	40.7	30.7	30.6	30.1	36.2	31.3	32.9	24.9	28.6	24.0
W3/25/R1-10B5	1.52	0.70	1.67	1.64	2.22	0.87	2.33	1.15	1.59	1.39

- a) Mo. Ab.: Monoclonal antibody (R1-3B3; pan T cell marker, R1-10B5; CD8 marker, W3/25; CD4 marker)
- b) LEW and F344 rats were inoculated with  $1 \times 10^7$  colony forming units of *Mycoplasma pulmonis*. Rats were sacrificed at 0, 2, 4, 8, and 12 weeks after inoculation and isolation of lymphocytes from lungs was performed.
- c) The percentage of T cell subsets of lymphocytes was analyzed by laser cytoflowmetry with various monoclonal antibodies.

**Table 3** The percentage of T cell subsets of lymphocytes in the spleen from LEW and F344 rats infected with *Mycoplasma pulmonis*.

weeks	0		2		4		8		12	
Mo. Ab. <sup>a)</sup>	LEW <sup>b)</sup>	F344	LEW	F344	LEW	F344	LEW	F344	LEW	F344
R1-3B3	48.2 <sup>c)</sup>	67.9	36.1	37.9	52.8	53.4	51.8	37.4	36.7	42.5
R1-10B5	19.3	37.4	26.0	17.3	15.5	22.5	24.8	22.0	17.9	24.2
W3/25	34.0	27.5	23.4	19.3	27.6	19.6	36.4	21.2	32.1	24.2
W3/25/R1-10B5	1.24	0.74	0.91	1.12	1.79	0.87	1.47	0.96	1.75	1.00

- a) Mo. Ab.: Monoclonal antibody (R1-3B3; pan T cell marker, R1-10B5; CD8 marker, W3/25; CD4 marker)
- b) LEW and F344 rats were inoculated with  $1 \times 10^7$  colony forming units of *Mycoplasma pulmonis*. Rats were sacrificed and isolation of lymphocytes from spleen was performed at 0, 2, 4, 8, and 12 weeks after inoculation.
- c) The percentage of T cell subsets of lymphocytes was analyzed by laser flowcytometry with various monoclonal antibodies.

### 3・7 M. pul. 感染ラット肺の免疫組織化学的解析

感染ラット肺に浸潤する単核細胞を、各種単クローン抗体を用いた酵素抗体法で識別した。

LEW ラットにのみ認められた胞隔炎を構成していた細胞、とくに肺胞中隔の血管を中心に集簇していた細胞は、T細胞が主であった (Fig. 8-a)。さらに、そのT細胞の亜群の検索結果は、ほとんどがCD4 マーカーである W3/25 陽性細胞であった (Fig. 8-b, c)。そのほか、肺胞中隔ではMφおよび顆粒球のマーカーである R2-1A6 陽性細胞も認められた (Fig. 8-d)。

### 3・8 M. pul. 感染ラットの M. pul. 抗原を用いた足蹠反応

感染8週目の LEW および F344 ラットを用い、M. pul. 抗原に対する DTH 反応成立の有無を足蹠反応で検討してみた (Fig. 9)。LEW ラットでは、足蹠の厚さが PBS 接種対照群の  $4.66 \pm 0.17$  mm に対し、M. pul. 抗原接種群は  $5.26 \pm 0.18$  mm と、有意 ( $p < 0.05$ ) に厚かった。しかし、F344 ラットでは、足蹠の厚さが PBS 接種対照群は  $3.73 \pm 0.09$  mm であるのに対し、M. pul. 抗原接種群では  $3.38 \pm 0.14$  mm であり、両者の間に有意差を認めなかった。

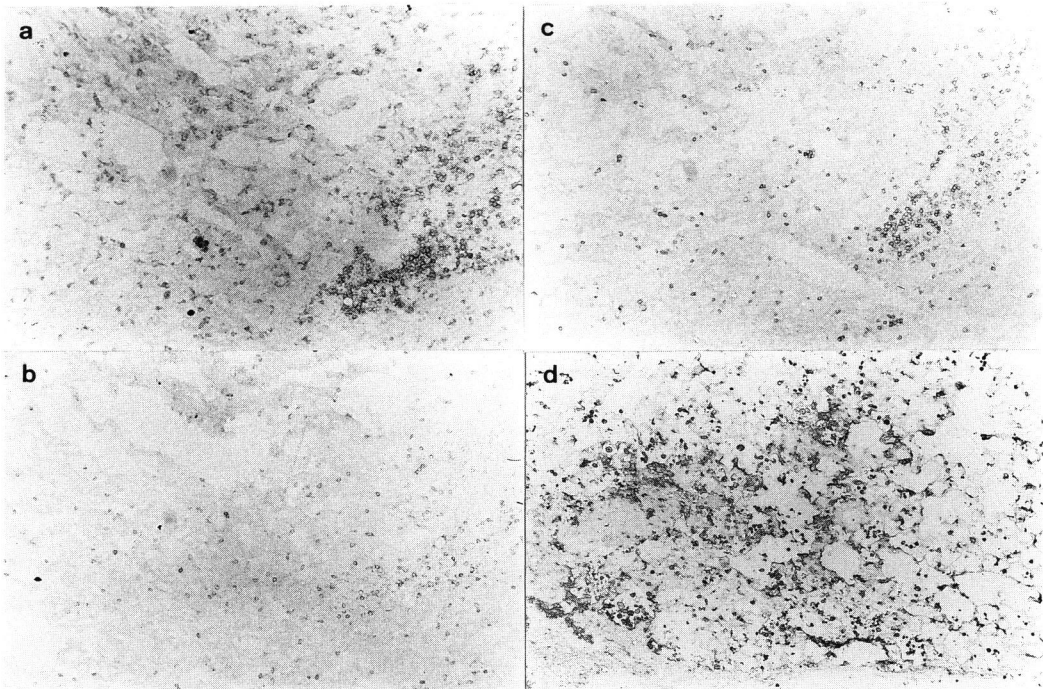


Fig. 8 Cryostat sections from lung tissue of *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW rats were stained by the immunoperoxidase technique with monoclonal antibodies (R1-3B3(a), R1-10B5(b), W3/25(c), and R2-1A6 (d)). Lymphocytes surrounding a blood vessel were predominantly R1-3B3(+)W3/25(+) helper/inducer T cells.

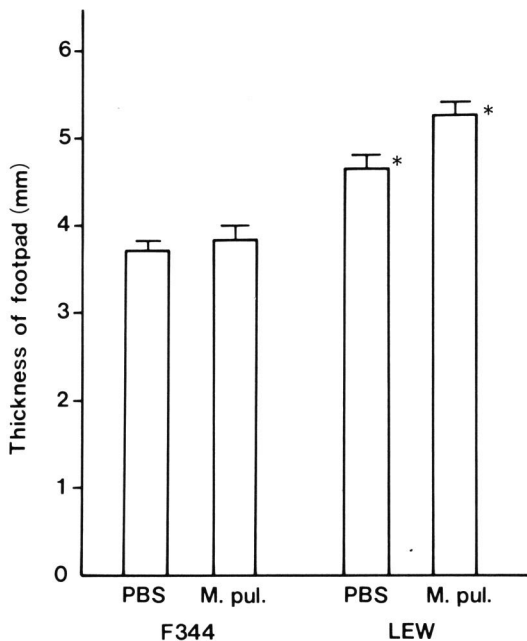


Fig. 9 Footpad swelling responses of *Mycoplasma pulmonis*-infected F344 and LEW rats to non-viable *Mycoplasma pulmonis* antigen. Response was significantly different between both strains of rats ( $P < 0.05$ ). No footpad swelling was observed in F344 rats.

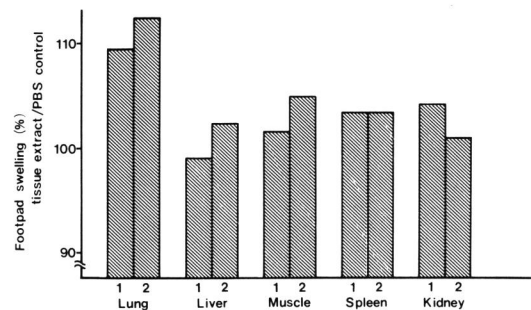


Fig. 10 Footpad swelling responses of *Mycoplasma pulmonis*-infected LEW rats to various tissue extracts. An extract of lung tissue evoked footpad swelling.

### 3・9 M. pul. 感染 LEW ラットを用いた各種臓器抗原による足蹠反応

感染 8 週目の LEW ラット各 2 匹を用い、各種臓器抗原に対して DTH 反応を示すか否かを足蹠反応で検討した。その結果は、Fig. 10 に示すごとく、肺抗原に対してのみ足蹠の肥厚を認めた。

#### 4 考 察

私共は Cassell ら<sup>10),11)</sup> に次いで、本邦では初めてラットで *M. pul.* の感染実験を行い、マイコプラズマ肺炎成立における *M. pul.* に対する宿主の免疫反応の關与について検討を行った。

##### 4-1 LEW と F344 ラットの *M. pul.* に対する感受性の差

ラット系統間にみられた *M. pul.* に対する感受性の差を、感染成立の有無(菌分離成績と CF 抗体価の推移)と肺炎病勢などで検討したところ、感染 2~4 週目の CF 指体価 (Fig. 3) や肺からの接種菌の回収率 (Fig. 2) では、LEW ラットの方が F344 ラットに比べ若干優っていたが、8 週および 12 週目では両系統ラットの間で菌量に差を認めなかった。特に強調すべきことは、F344 ラットでも充分感染は成立していたことであった。しかし、肺炎形成能からみると、感染 LEW ラットでは、いわゆるマイコプラズマ肺炎が認められたが、F344 ラットでは BALT の過形成はみられるものの、ほとんど肺病変を形成しなかった。これらラットの系統間にみられた感受性の差異に關する所見のなかで、菌の回収と肺病変形成率は Davis らの報告<sup>10)</sup> とほとんど同じと見なすことができた。

Davis らは CF 抗体については述べていないが、LEW ラットより F344 ラットの方が *M. pul.* に対する抗体価が低かった。その原因としては、Tada ら<sup>27)</sup> が F344 ラットは SRBC や OVA (egg albumin), bovine gammaglobulin に対する抗体産生能が、他のラットより低いといっていることと関連性があるかも知れない。しかし、F344 ラットにおいても抗体価の上昇があるということは、少なくとも同ラットの抗原提示細胞は *M. pul.* に対して正常に働いていると思われた。なお、LEW と F344 ラットの免疫遺伝学的検討では、MHC (Major histocompatibility complex) が同一であるにもかかわらず<sup>28)</sup>、互いに皮膚移植は拒絶することから、両者には minor histocompatibility complex に差異が存在すると言われている<sup>29)</sup>。従って、ラットの *M. pul.* に対する感受性は、MHC に link した免疫応答遺伝子と相關していないものと思われた。

##### 4-2 ラットリンパ球の各種マイトーゲン感受性

Naot ら<sup>30)</sup> は *M. pul.* の死菌を LEW ラットに経鼻接種して、1 週目で剖検したとき、*M. pul.* 感染による間質性肺炎や気管支炎と区別できない炎症を認め、さらに同一条件で T 細胞マイトーゲンである Con A をラットに投与したときは、間質性肺炎のみが形成されるこ

とを明らかにした。したがって、Naot ら<sup>30)</sup> はマイコプラズマ肺炎形成に *M. pul.* のリンパ球に対するマイトーゲン活性が、主要な役割をなしていると推定している。

私共の成績では、正常な肺に存在するリンパ球数は LEW と F344 ラットの間で全く差を認めなかったが、各種マイトーゲンの存在下におけるこれらラットのリンパ球の増殖能には、以下に示すごとく、いくつか異なる所見が得られた。

B 細胞マイトーゲン (LPS, STM) に対しては、LEW ラット由来のリンパ球の方が、F344 ラットより明らかに高い感受性を示していたが、T 細胞マイトーゲン (Con A, PHA) によるリンパ球の増殖能には、両者の間で差を認めることはできなかった。

一方、一般にマイコプラズマの菌体<sup>31),32),33),34)</sup> およびその抽出液<sup>35),36)</sup> は、リンパ球に対しマイトーゲン活性を示すことが知られている。*M. pul.* の場合もまた T 細胞と B 細胞の両者に対し、マイトーゲン活性のあることが、Naot ら<sup>37)</sup> によって明らかにされている。

Davis ら<sup>12)</sup> は、*M. pul.* によって惹起される LEW と F344 ラットのリンパ球の幼若化反応は、LEW ラットの方が F344 ラットより強く反応していることから、肺炎形成能が LEW ラットで高いということと関連性があるものと推測している。私共の成績ではリンパ球に対する *M. pul.* のマイトーゲン活性は両系統ラットの間で差が認められず、単純にマイコプラズマ肺炎の形成をマイトーゲン活性だけでは説明できないと思われた。

##### 4-3 感染動物の *M. pul.* 抗原および正常ラット臓器抗原による DTH 反応

マイコプラズマ感染症では、マイコプラズマの菌体抗原による皮内反応が成立することはよく知られている<sup>38),39),40)</sup>。特にマイコプラズマ肺炎を発症している場合は皮内反応が高率に陽性になるという報告もみられることから<sup>40),41)</sup>、今回の *M. pul.* 感染ラットでも *M. pul.* の死菌を抗原として皮内反応を実施してみた。その結果、LEW ラットにのみ皮内反応が陽性となる傾向を示した。

そのほか、*M. pneumoniae* 感染ハムスターでは、DTH 反応のパラメーターの一つである腹腔 Mφ の遊走阻止活性が、肺炎の病勢と相關して検出できることを Biberfeld らは、明らかにしている<sup>42)</sup>。

*M. pneumoniae* は正常臓器との間に共通抗原をもっており、*M. pneumoniae* 感染血清は臓器抗原との間で CF 反応が成立することが知られている<sup>43),44),45)</sup>。また、

*M. pneumoniae*に感染したヒトの血中には寒冷血球凝集素が検出されることなどから<sup>46)</sup>、マイコプラズマ感染症が自己免疫病としての特性をも兼ね備えていると推測されている<sup>47),48)</sup>。したがって、*M. pul.*感染ラットの肺炎成立に関与しているものとして、*M. pul.*に対する細胞性免疫や*M. pul.*の持つマイトーゲン活性だけでなく、自己臓器に対する免疫反応の存在も考えられたため、*M. pul.*感染 LEW ラットに各種臓器抗原を用いた皮内反応を行ってみた。その結果は、肺抗原を用いることによってのみ皮内反応が陽性となることが判明した。このことは、 $T_{DTH}$  (DTH type T) 細胞が*M. pul.*と肺組織の共通抗原を認識し、皮内反応という型で DTH 反応が成立したことを意味するものと思われる。

#### 4・4 *M. pul.*感染ラットの肺浸潤リンパ球および脾細胞にみられる T 細胞亜群の検索

*M. pul.*感染動物にみられる肺炎病巣のリンパ球や、脾細胞に分布する T 細胞亜群の解析は、ほとんどなされていない。そこで、今回は*M. pul.*感染ラットの肺と脾細胞由来 T 細胞の亜群を検索した結果は、LEW ラットでは肺炎の進行に伴って CD8 陽性細胞に比べ、CD4 陽性細胞が優勢になり、CD4/CD8 の値が上昇していた。

また、免疫病理組織化学的解析でも LEW ラットの肺臓中隔に浸潤している単核細胞の主体は、CD4 陽性細胞と  $M\phi$  であり、先に述べた CD4 陽性細胞優位の所見を裏付けていると思われる。また、これらの細胞による炎症形成は、 $T_{DTH}$  細胞と  $M\phi$  が共同して肺組織を傷害することによると私共は推定している。

以上、T 細胞亜群の観察結果は、LEW ラットの間質性肺炎、特に胞隔炎の形成には、IV 型アレルギー反応に関与していると思われるものであった。また、*M. pul.*感染 F344 ラットの場合は肺炎がほとんどみられない。その原因の一つに肺では常に CD8 陽性細胞優位であることと関連性があると思われた。なお、F344 ラットの CF 抗体価の所見もまた、F344 ラットでは CD8 陽性細胞が優位なため、B 細胞機能に対し抑制的に働くので、CF 抗体価が LEW ラットのように上昇できない可能性があると思われた。

さらに、最近、私共は*M. pul.*感染ラットの T 細胞を正常ラットの腹腔内に移入し、レシピエントラットの肺に間質性肺炎を形成し得ることに成功している<sup>49)</sup>。

これまでの所見から、*M. pul.*感染ラットの肺病変形成に関連する因子は、Naot らが示すような*M. pul.*のマイトーゲンに対する反応性に起因するのではなく、むしろ*M. pul.*感染によって増殖する  $T_{DTH}$  細胞が重要で

あると考えられた。私共はこの  $T_{DTH}$  細胞が*M. pul.*菌体のみならず、*M. pul.*と共通抗原を有する肺組織をも認識するという自己免疫反応の肺病変形成への関与を考慮すべきであると考えている。

## 5 結 語

ラットを用いた*M. pul.*の感染実験を行い、マイコプラズマ肺炎成立に及ぼす*M. pul.*特異的遅延型アレルギー反応について検討した成績は、以下に示す如くである。

- 1) MHC が同一にもかかわらず、LEW と F344 ラットの肺病変の成立に明確な差があった。しかし、肺からの菌分離と CF 抗体価に関しては若干の差は存在するが、肺病変の成立しない F344 ラットでも菌は感染 12 週まで分離され、抗体価の上昇が認められた。
- 2) *M. pul.*の死菌は T 細胞および B 細胞に対しマイトーゲン活性をもっているが、正常ラットの B 細胞マイトーゲンに対する反応性は、LEW ラットの方が F344 ラットより高い反応性を示した。T 細胞マイトーゲンおよび*M. pul.*に対する反応性は両者の間で差を認めなかった。
- 3) *M. pul.*感染ラットの肺および脾細胞にみられる T 細胞亜群の割合は、LEW ラットの場合は CD4/CD8 の値が肺炎の進行に伴って上昇する傾向を示したが、F344 ラットでは感染 2 週目と 12 週目を除く全ての感染相で、CD8 陽性細胞が優位である傾向を示した。
- 4) *M. pul.*感染 LEW ラットの肺炎組織標本上で、病変部に集簇する単核細胞の T 細胞亜群の分布状況を、免疫酵素抗体を用いて検索した。肺炎組織では CD4 陽性細胞が優位で、とくに肺臓中隔には  $M\phi$  と共に浸潤していることが明らかになった。
- 5) *M. pul.*感染 LEW ラットは、*M. pul.*抗原による皮内反応陽性であり、*M. pul.*抗原と共通抗原をもつと言われている正常肺組織抗原による皮内反応もまた陽性であった。

以上、*M. pul.*感染ラットにおける肺病変の成立に関与する因子は、i) *M. pul.*のマイトーゲン活性、ii) CD4 陽性 T 細胞による IV 型アレルギー反応、iii) *M. pul.*と共通抗原をもつ肺組織を認識する  $T_{DTH}$  細胞などによる DTH 反応が主であり、CD8 陽性細胞は肺病変形成に抑制的に働くと推測された。

本稿をおえるにあたり、御指導、御校閲下さった本学内科学第 3 講座 鈴木 明教授及び本学病理学第 1 講座 菊地浩吉教授に深謝します。また種々の貴重な

御助言を頂いた本学病理学第一講座松浦晃洋先生に感謝いたします。

## 文 献

1. Clyde, W. A. Jr.: *Mycoplasma pneumoniae* infection of man, In: Tully, J. G. and Whitcomb, R. F.: *The Mycoplasmas II Human and animal mycoplasmas*. 275-306, Academic press. New York (1985)
2. Koletsky, R. J. and Weinstein, A. J.: Fulminant mycoplasmal pneumonia infection. *Am. Rev. Res. Dis.* **122**, 491-496 (1980)
3. 梅枝愛郎, 松井茂, 福山展, 片貝重之, 中沢次夫, 桑原英真, 笛木隆三, 小査節雄, 北市正則: 開胸肺生検で類上皮細胞肉芽腫とマッソン体形成が認められたマイコプラズマ肺炎の1例. *日胸* **22**, 52-56 (1984)
4. Mizutani, H., Mizutani, H., Kitayama, T., Hayakawa, K., Nagayama, E., Kato, J., Tamura, E. and Isuchi, T.: Delayed hypersensitivity in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Lancet* **1**, 186-187 (1971)
5. Denny, F. W., Taylor-Robinson, D. and Allison, A. C.: The role of thymus-dependent immunity in *Mycoplasma pulmonis* infections of mice. *J. Med. Microbiol.* **5**, 327-336 (1972)
6. Fernald, G. W. and Clyde, W. A. Jr.: Pulmonary immune mechanism in *Mycoplasma pneumoniae* disease, In: Kirkpatrick, C. H. and Reynold, H. Y.: *Immunologic and infectious reactions in the lung*. 101-130, Academic press (1976)
7. Fernald, G. W., Clyde, W. A. Jr. and Bienenstock, J.: Immunoglobulin containing cells in lungs of hamsters infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Immunol.* **108**, 1400-1408 (1972)
8. Gale, G. L. and Kenny, G. E.: Complement dependent killing of *Mycoplasma pneumoniae* by antibody: Kinetics of the reaction. *J. Immunol.* **104**, 1175-1183 (1970)
9. Cassell, G. H., Lindsey, J. R., Overcash, R. G. and Baker, H. J.: Murine mycoplasma respiratory diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 395-412 (1973)
10. Davis, J. K. and Cassell, G. H.: Murine respiratory mycoplasmosis in LEW and F344 rats: strain differences in lesion severity. *Vet. Pathol.* **19**, 280-293 (1982)
11. Davis, J. K., Thorp, R. B., Maddox, P. A., Brown, M. B. and Cassell, G. H.: Murine respiratory mycoplasmosis in F344 and LEW rats: evolution of lesions and lung lymphoid cell populations. *Infect. Immun.* **36**, 720-729 (1982)
12. Davis, J. K., Simecka, J. W., Williamson, J. P., Ross, S. E., Juliana, M. M., Thorp, R. B. and Cassell, G. H.: Nonspecific lymphocyte responses in F344 and LEW rats: Susceptibility to murine respiratory mycoplasmosis and examination of cellular basis for strain differences. *Infect. Immun.* **49**, 152-158 (1985)
13. Hayflick, L.: Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas. Rep. Biol. Med.* **23** (Suppl. 1), 285-303 (1965)
14. Chanock, R. M., James, W. D., Fox, H. H., Turner, H. C., Mufson, M. A. and Hayflick, L.: Growth of eaton PPLO in broth and preparation of complement fixing antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 884-889 (1962)
15. Lowry, O. L., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
16. Tamura, H., Ishihara, C., Sasama, A., Tajima, M., Kuwamizu, I. and Maejima, K.: Efficacy of hemadsorption for rapid identification of *Mycoplasma pulmonis*. *Lab. Anim. Sci.* **31**, 713-714 (1981)
17. 伝染病研究所学友会編: 細菌学実習提要, 259-282, 丸善書店 (1958)
18. Matsuura, A., Ishii, Y., Yuasa, H., Narita, H., Kon, S., Takami, T. and Kikuchi, K.: Rat T lymphocyte antigens comparable with mouse Lyt-1 and Lyt-2, 3 antigenic systems: Characterization by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**, 316-322 (1984)
19. White, R. A., Masson, D. W., Williams, A. F., Galfre, G. and Milstein, C.: T lymphocyte heterogeneity in the rat: Separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **148**, 664-673 (1978)
20. Ishii, Y., Matsuura, A., Iwaki, H., Takami, T. and Kikuchi, K.: Two closely related antigens expressed on granulocytes, macrophages and some reticular element in rat lymphoid tissues: Characterization by monoclonal antibodies. *Immunology* **51**, 477-487 (1984)
21. Hunninghake, G. W. and Fauci, A. S.: Immunological reactivity of the lung: A guinea pig model for the study of pulmonary mononuclear cell subpopulations. *Cell. Immunol.* **26**, 89-97 (1976)
22. Liu, M. C. L., Ishizaka, K. and Plaut, M.: T lymphocyte responses of murine lung: Immunization with alloantigen induces accumulation of

- cytotoxic and other T lymphocytes in the lung. **J. Immunol.** **129**, 2653-2661 (1982)
23. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **J. Histochem. Cytochem.** **29**, 577-580 (1981)
  24. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A., Shimokawara, I. and Kikuchi, K.: Immunohistochemical study of lymphocytes in rat pineal gland: Selective accumulation of T lymphocytes. **Anat. Rec.** **199**, 239-247 (1981)
  25. Uede, T., Ishii, Y., Matsuura, A. and Kikuchi, K.: Thy-1 antigen on rat bone marrow cells: Immunohistochemical and fine morphological studies. **Tohoku J. Exp. Med.** **136**, 391-404 (1982)
  26. Bradley, L. M.: Mitogen induced response, In: Mishell, B. B. and Shigi, S. M.: Selected methods in cellular immunology. W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)
  27. Tada, N., Itakura, K. and Aizawa, M.: Genetic control of antibody response in inbred rats. **J. Immunogenet.** **1**, 265-275 (1974)
  28. Cramer, D. V., Kunz, H. W. and Gill, T. J. III.: Immunogenetics, In: Baker, H. J., Lindtey, J. R. and Weisbroth, S. H.: The laboratory rat. research applications, 213-224, Academic Press, New York (1980)
  29. Gill, T. J. III., Crammer, D. V. and Kunz, H. W.: The major histocompatibility complex-comparison in the mouse, man and rat. **Am. J. Pathol.** **90**, 736-777 (1978)
  30. Naot, Y., Davidson, S. and Lidenbaum, E. S.: Mitogenicity and pathogenicity of *Mycoplasma pulmonis* in rats: I. Atypical interstitial pneumonia induced by mitogenic Mycoplasma membranes. **J. Infect. Dis.** **143**, 55-6 (1981)
  31. Biberfeld, G.: *Mycoplasma pneumonia* is a polyclonal B-cell activator. **Nature** **261**, 238-239 (1976)
  32. Biberfeld, G.: Activation of human lymphocyte subpopulation by *Mycoplasma pneumoniae*. **Scand. J. Immunol.** **6**, 1145-115 (1977)
  33. Naot, Y., Tully, J. G. and Ginsburg, H.: Lymphocyte activation by various mycoplasma strains and species. **Infect. Immun.** **18**, 310-317 (1977)
  34. Naot, Y. and Ginsberg, H.: Activation of B lymphocytes by mycoplasma mitogen(s). **Immunology** **34**, 715-720 (1978)
  35. Cole, B. C., Daynes, R. A. and Word, J. R.: Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritis*: I. Transformation is associated with an H-2 linked gene that maps to the I-E/I-C subregion. **J. Immunol.** **127**, 1931-1936 (1981)
  36. Cole, B. C., Sullivan, G. J., Daynes, R. A., Sayed, I. A. and Ward, J. R.: Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritis*: II. Cellular requirements for T cell transformation mediated by a soluble *Mycoplasma* mitogen. **J. Immunol.** **128**, 2013-2018 (1982)
  37. Naot, Y., Merchav, S., Ben-David, E. and Ginsberg, H.: Mitogenic activity of *Mycoplasma pulmonis*: I. Stimulation of rat B and T lymphocytes. **Immunology** **36**, 399-406 (1979)
  38. Gourlay, R. N. and Palmer, R. F.: Further studies on the allergic reaction on contagious bovine pleuropneumonia. **J. Comp. Pathol.** **71**, 89-95 (1965)
  39. Roberts, D. H., Windsor, R. S., Masiga, W. N. and Kariavu, C. G.: Cell-mediated immune response in cattle to *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides*. **Infect. Immun.** **8**, 349-354 (1973)
  40. Decker, J. L. and Barden, J. A.: *Mycoplasma hyorhinis arthritis* of swine: A model for rheumatoid arthritis? **Rheumatology** **6**, 338-345 (1975)
  41. Fernald, G. W.: *Mycoplasma pneumoniae* delayed hypersensitivity tests in guinea pigs. **Bacteriol. Proc.** **1971**, 103 (1971)
  42. Biberfeld, G.: Macrophage migration inhibition in response to experimentally induced Mycoplasma pneumoniae infection in the hamster. **J. Immunol.** **110**, 1146-1151 (1973)
  43. Thomas, L., Curnen, E. C., Mirick, G. S., Zijgler, J. E. Jr. and Horsfall, F. L.: Complement fixation with dissimilar antigens in primary atypical pneumonia. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **52**, 121-125 (1943)
  44. Thomas, L.: Circulating autoantibodies and human disease: With a note on primary atypical pneumonia. **N. Engl. J. Med.** **270**, 1157-1159 (1964)
  45. Biberfeld, G.: Antibodies to brain and other tissues in cases of *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Clin. Exp. Immunol.** **8**, 319-333 (1971)
  46. Lind, K.: Production of cold agglutinins in rabbits induced by *Mycoplasma pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, or *Streptococcus Mg*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** **81**, 487-496 (1973)
  47. Fernald, G. W.: Immunologic interactions

between host cells and Mycoplasmas: An introduction. **Rev. Infect. Dis.** 4, s201-204 (1982)

48. Stanbridge, E. J.: Mycoplasma-lymphocyte interaction and their possible role in immunopathologic manifestation of mycoplasmal disease. **Rev. Infect. Dis.** 4, s219-226 (1982)

49. 鈴木 明, 菅原洋行, 小場弘之: 実験的マイコプラ

ズマ肺炎, DTH 型ヘルパーT 細胞移入による肺病変の作製. 厚生省特定疾患 間質性肺疾患調査研究 昭和 61 年度研究報告書, 19-21 (1987)

---

別刷請求先:

(〒 060) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目

札幌医科大学内科学第 3 講座 菅原洋行